

На правах рукописи

**СОКОЛОВА ЕВГЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕИНАЗ ПОЗДНЕЙ ФАЗЫ  
РОСТА *BACILLUS INTERMEDIUS* 3-19**

**03.00.07 – микробиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**

Казань – 2006

Работа выполнена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета ГОУВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина».

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Нэлли Павловна Балабан

**Официальные оппоненты:** доктор ветеринарных наук, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Казанской государственной ветеринарной академии им. Н.Э. Баумана профессор Госманов Рауис Госманович  
кандидат биологических наук, заведующий отделением культивирования и идентификации вирусов РЦПБ СПИД и ИБ МЗ РТ старший научный сотрудник Уразов Наиль Гумерович

**Ведущая организация:** Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

Защита диссертации состоится «14» декабря 2006 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан « 9 » ноября 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

**Актуальность проблемы.** Протеолитические ферменты представляют собой уникальную группу биологических катализаторов. Функции этих ферментов разнообразны – они принимают участие в процессах катаболизма, посттрансляционном процессинге белков, задействованы в процессах эмбриогенеза эукариот. Выявленная в последние годы способность микробных протеиназ к осуществлению реакции селективного протеолиза таких белков крови человека, как фибрин, плазминоген и протеин С, определяет перспективность использования этих ферментов для коррекции гемостаза человека при профилактике, диагностике и лечении атеросклероза и таких его последствий, как тромботические состояния. Важным свойством протеиназ является их способность к ферментативному синтезу олигопептидов, что перспективно для получения биологически активных соединений и лекарственных препаратов. В настоящее время с помощью этого метода получают аспартам (искусственное подслащающее вещество).

Одним из наиболее интересных семейств класса протеолитических ферментов являются сериновые протеиназы бацилл. В стационарной фазе роста бациллы секретируют сериновые и нейтральные протеиназы, которые играют определенную роль в адаптационных процессах и, в частности, в спорообразовании. Показано, что сериновые протеиназы принимают непосредственное участие в процессе синтеза споровой оболочки и прорастании спор. Так, протеиназа TesA, секретирующаяся в среду спорулирующими клетками *Bacillus subtilis*, вовлекается в построение оболочки споры [Serrano et al., 1999]. Обнаружено, что продукт гена *clpP* представляет собой протеиназу, играющую важную роль в период стационарной фазы роста *B. subtilis*. Этот белок является определяющим для роста клеток в условиях теплового шока [Msadek et al., 1988]. Неослабевающий интерес к этим белкам обусловлен также широтой практического применения. Выход целевого продукта у бацилл может быть существенно повышен за счет направленного воздействия на условия роста, использования штаммов с нарушениями систем регуляции либо модификацией гена. На основе протеиназ бацилл конструируются каталитические антитела с протеолитической активностью. Выделены протеиназы бацилл, обладающие фибринолитическими и тромболитическими свойствами. В связи с ростом числа тромбических заболеваний актуальным является поиск новых эффективных протеолитических ферментов, обладающих высокой активностью, специфичностью и низкой токсичностью. Одной из подгрупп сериновых протеиназ являются глутамилэндопептидазы, обладающие узкой субстратной специфичностью. Они используются как высокоточные «инструменты» для фрагментации белковых молекул при исследовании их первичной структуры, а также как удобные модели для конструирования белков с заданными свойствами.

**Целью** настоящей работы явилось выделение глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемых в поздней стационарной фазе роста бактерий, очистка и изучение свойств этих ферментов.

#### **Основные задачи исследования.**

1. Исследование влияния экзогенных факторов питательной среды на накопление внеклеточных протеиназ *B. intermedius* в поздней стационарной фазе роста бактерий.

2. Выделение из культуральной жидкости *B. intermedius* гомогенных препаратов протеиназ и их идентификация.
3. Исследование влияния ингибиторов на активность ферментов.
4. Определение энзиматических и каталитических свойств ферментов.
5. Определение субстратной специфичности глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной сериновой протеиназы.
6. Установление аминокислотного состава и N-концевой последовательности протеиназ *B. intermedius*.

**Научная новизна.** Установлено, что бактерии *B. intermedius* 3-19 активно синтезируют и секретируют протеолитические ферменты в течение всей стационарной фазы роста. Впервые из культуральной жидкости *B. intermedius* 3-19 в поздней стационарной фазе роста выделены глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа, так называемые поздние ферменты. Определены условия биосинтеза обоих ферментов и подобран состав питательной среды для максимального синтеза этих протеиназ. Получены данные, свидетельствующие о том, что каталитические характеристики ранних и поздних протеиназ различны, тогда как энзиматические и физико-химические свойства схожи. Установлены N-концевые последовательности аминокислот для глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы поздней стационарной фазы роста и показано, что они идентичны ранним ферментам.

**Практическая значимость.** Полученные в работе результаты позволяют использовать штамм *B. intermedius* 3-19 как эффективный продуцент протеолитических ферментов. Подобраны оптимальные питательные среды для максимальной продукции глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы поздней стационарной фазы роста. Разработаны методы очистки поздних белков. Получение гомогенных препаратов ферментов увеличивает арсенал белков, используемых в научных исследованиях и в практических целях. Результаты исследования свойств ферментов поздней стационарной фазы роста позволят расширить наши представления о сериновых протеиназах, в частности о субтилизиноподобных протеиназах и об особой подгруппе ферментов – глутамилэндопептидазах.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования:** Работа выполнялась в соответствии с планом НИР КГУ (№ государственной регистрации 01.2.00 104982 «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»; № государственной регистрации 01.2.006 09683 «Механизмы регуляции функциональной активности клетки»). Научные исследования поддержаны грантами РФФИ 01-04-48037, 05-04-48182а, АНТ 03.3.10-11, 03.3.10-295 и грантом Программы CRDF REC 007. Исследования получили персональную поддержку Правительства Российской Федерации (2002 г) и были удостоены специальной медали Российской академии наук с премиями для молодых ученых РАН (2003 г.).

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Впервые обнаружены, выделены и охарактеризованы протеолитические ферменты (глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа) поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* 3-19.

2. Ферменты ранней и поздней фазы роста *B. intermedius* 3-19 имеют определенные различия в каталитических характеристиках, а именно, различаются по константе Михаэлиса и каталитической константе.

3. Идентичные аминокислотные последовательности N-концов глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы ранней и поздней фаз роста *B. intermedius* 3-19 позволяют считать эти ферменты продуктами экспрессии одного гена, а различия в каталитических характеристиках связать с возможной посттранскрипционной модификацией белков *B. intermedius* 3-19.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и региональных конференциях: 9-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2005г.), итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (2002 г. – 2004 г.), XLII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс», секция биология (Новосибирск, 2004), FEMS Congress of European Microbiologist «Bacillus-2003» (Ljubljana, Slovenia, 2003), на V симпозиуме по химии протеолитических ферментов (Москва, 2002), на III съезде Биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002), а также на семинарах кафедры микробиологии и Института биологии Казанского государственного университета.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 24 научные работы.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность научному руководителю кандидату биологических наук Н.П. Балабан; благодарит доктора химических наук Г.Н. Руденскую (МГУ им. Ломоносова) за возможность определения энзиматических свойств ферментов на базе её лаборатории; доктора биологических наук О.Н. Ильинскую и кандидата биологических наук Л.А. Габдрахманову за поддержку и помощь в обсуждении результатов; доктора биологических наук М.Р. Шарипову за внимательное отношение к работе.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, включает 5 таблиц, 24 рисунка. Библиография содержит 147 наименований российских и зарубежных авторов.

## Материалы и методы

**Бактериальный штамм.** Объектом исследования служил штамм *B. intermedius* 3-19 (В-3833, Всесоюзная коллекция промышленных микроорганизмов), выделенный из штамма *Bacillus intermedius* 7P (коллекция кафедры микробиологии Казанского государственного университета) методом рассева на среде, содержащей стрептомицин (500 мкг/мл). Штамм *B. intermedius* 3-19 был отобран из числа антибиотикоустойчивых штаммов *B. intermedius* по признаку максимальной продукции протеиназ.

**Исходной средой для культивирования** клеток служила среда следующего состава (г/л):  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3,  $\text{NaCl}$  – 3,0,  $\text{MnSO}_4$  – 0,1, пептон – 20 г/л. pH среды равен 8,5. Среду стерилизовали при 1 атм в течение 1 часа. Растворы неорганического фосфата ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) и растворы солей

двухвалентных металлов стерилизовали при 1 атм и вносили в среду перед посевом: неорганический фосфат в конечной концентрации 0,2 г/л, ионы металлов – 2, 5 и 10 мМ. Растворы дрожжевого экстракта, казеина по Гаммерстену и желатина стерилизовали при 0,5 атм и вносили в питательную среду в конечной концентрации 0,1%, 0,5% и 1%. Растворы стерильных LD-аминокислот вносили в среду до конечной концентрации 1,0 мг/мл. Растворы цитрата аммония и хлористого аммония стерилизовали при 1 атм и вносили в среду перед посевом до конечной концентрации 2 – 8 мМ.

**Культивирование** проводили при 30° на вибростенде, 200 об/мин. Соотношение объёма среды к объёму колбы составляло 1:5. Посевным материалом служила 12 - 18 часовая культура (1% v/v), выращенная на среде с добавлением 500 мкг/мл стрептомицина.

При исследовании влияния глюкозы на биосинтез поздних протеиназ вносили стерильный раствор глюкозы в опытные колбы в конечной концентрации 2% перед началом культивирования и в концентрации 1% на 34-й, 36-й и 38-й часы роста для глутамилэндопептидазы, и 36-й, 38-й и 40-й часы для субтилизиноподобной протеиназы. В течение 6 часов через каждые 2 часа из колб отбирали пробы для определения прироста биомассы и активности.

Количество свободных спор выражали в процентах по отношению к общему числу вегетативных и спорулирующих клеток (100%), подсчет которых проводили в режиме фазово-контрастной микроскопии (микроскоп Carl Zeiss Jena) при увеличении в 1600 раз в 5 - 10 полях зрения. В качестве инокулята использовали синхронную 50-часовую культуру.

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на КФК–2 при длине волны 590 нм. Количество биомассы выражали в единицах светопоглощения в кювете толщиной 1 см.

Продуктивность культуры в отношении синтеза протеиназ определяли как отношение величины протеолитической активности в культуральной жидкости к величине биомассы и выражали в условных единицах [Перт с соавт., 1980] или в процентах относительно контроля.

Для получения чистых ферментов культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием в течение 60 минут при 3000 об/мин на центрифуге К-70 (Janetzki, Польша).

**Белок и протеолитическая активность.** Белок определяли спектрофотометрически, считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует  $A_{280} = 1$  оптической единице (оп. ед.) в кювете толщиной 1 см.

Определение протеолитической активности протеиназ проводили по гидролизу казеина [Каверзнева с соавт., 1971] и синтетических хромогенных субстратов [Мосолова с соавт., 1987].

За единицу казеинолитической активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкМ тирозина за 1 мин на 1 мл ферментного раствора.

Протеолитическую активность глутамилэндопептидазы определяли по гидролизу синтетического субстрата Z-Glu-pNa, активность субтилизиноподобной протеиназы определяли с помощью синтетического субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa.

За единицу активности ферментов по гидролизу синтетических субстратов принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1мкМ субстрата за 1 мин. За единицу активности ферментов, определяемых в культуральной жидкости, принимали количество фермента, гидролизующее 1нМ субстрата за 1 мин.

Продуктивность культуры определяли как отношение величины протеолитической активности к величине биомассы и выражали в условных единицах или процентах.

Поскольку синтетические полипептиды Z-Glu-pNa и Z-Ala-Ala-Leu-pNa являются специфическими субстратами для глутамилэндопептидаз и субтилизинов, соответственно, то их использовали для идентификации полученных после хроматографии на колонке MonoS белковых пиков.

**Активность  $\beta$ -галактозидазы** определяли в соответствии со стандартным методом, как описано ранее [Балабан с соавт., 2003].

За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало увеличение оптической плотности на одну оптическую единицу при 420 нм на 1 мл ферментного препарата за 1 час инкубации при 37°.

Для получения клеточного лизата клетки бактерий разрушали при 0° с помощью ультразвука (УЗДИ-IV 4.2) при частоте 22 кГц (15 раз по 30 сек). Затем в лизатах клеток определяли активность  $\beta$ -галактозидазы.

**Выделение и очистка поздних протеиназ.** Культуральную жидкость *B. intermedius* освобождали от клеток центрифугированием, доводили до pH 6,3, разводили водой в 10 раз и добавляли к КМ-целлюлозе, уравновешенной 0,02 М Na-ацетатным буфером, pH 6,3, перемешивали в течение 10 – 15 мин., отстаивали, надосадочную жидкость декантировали. Затем КМ-целлюлозу помещали в колонку (1,5 x 17 см), промывали уравнивающим буфером и элюировали 0,2 М Na-ацетатным буфером, pH 6,3. Элюат разбавляли в 10 раз и наносили на колонку MonoS 5/5 в системе FPLC “Pharmacia”, уравнивленную 0,015 М Na-ацетатным буфером, pH 6,3, содержащим 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>. Элюцию проводили линейным градиентом (0-0,5М NaCl) в том же буфере со скоростью 1 мл/мин. Для получения хроматографически гомогенных препаратов белков проводили рехроматографию на колонке MonoS в тех же условиях. Полученные белки, активные по Z-Glu-pNa или Z-Ala-Ala-Leu-pNa, обессоливали на сефадексе G-25 и лиофильно высушивали [Остерман с соавт., 1985, Скоупс Р., 1985].

**Физико-химические и кинетические свойства ферментов.** Для определения степени чистоты препаратов ферментов и их молекулярной массы проводили электрофорез в 12,5%-ном ПААГ в присутствии 0,1% DS-Na по методу Лаэммли [Laemmli, 1970]. В качестве белков-маркеров использовали бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овальбумин (43 кДа), ингибитор трипсина (20,1 кДа) и лизоцим (14,4кДа). Для определения констант Михаэлиса ( $K_m$ ) использовали субстраты Z-Glu-pNa, а также субстрат Z-Ala-Ala-Leu-pNa, растворенный в 20% диметилформамиде (ДМФА) в концентрации 0,2 – 3,3 mM. Начальные скорости гидролиза субстратов определяли на спектрофотометре при длине волны 400 нм и 20° с временным интервалом равным 1 мин., считая молярный коэффициент поглощения для п-нитроанилина равным 8900 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Величину  $K_m$  определяли графически из зависимости 1/[v] от 1/[S] [Ленинджер, 1985].

Изоэлектрические точки белков определяли методом изоэлектрофокусирования в 5% полиакриламидном геле в присутствии 2% амфолинов Biolyte 3/10 в мини-колонке IEF Cell (Bio-Rad, США). Для калибровки колонки использовали коммерческий набор маркерных белков («Serva», Германия).

**Влияние ингибиторов на активность ферментов.** Влияние ингибиторов на активность ферментов определили, используя DFP, PMSF, TLCK, EDTA, офенантролин, бензамидин и  $\text{HgCl}_2$  в молярном соотношении фермент:ингибитор 1:100; p-CMB в соотношении 1:130. Белковые ингибиторы: утиный овомукоид, соевый ингибитор трипсина, ингибитор из морской анемоны использовали в молярном соотношении 1:10. Ингибирование проводили в течение 1 часа, инкубируя пробы при 22°, после чего определяли остаточную активность по гидролизу синтетических хромогенных субстратов.

**Энзиматические свойства ферментов.** pH-Оптимум протеиназ определяли, используя в качестве субстратов казеин, Z-Glu-pNa и Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Для казеина использовался буфер 0,1 М трис-HCl буфер, pH 7,2 – 10,0; для синтетического хромогенного субстрата Z-Glu-pNa – 0,1 М трис-HCl буфер при значениях pH от 7,2 до 9,5; для субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa – 0,05М трис-HCl буфер при значениях pH 7,5 – 10,0.

pH-Стабильность ферментов определяли по гидролизу синтетических хромогенных субстратов в тех же условиях. Ферменты инкубировали в 0,1 М трис-HCl буфере при различных значениях pH (7,2 – 9,5) в течение 2 часов при комнатной температуре в присутствии и в отсутствие 0,5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , после чего определяли активность по стандартной методике. В качестве контроля (100%) считали активность ферментов, полученную без предварительной инкубации.

Температурный оптимум ферментов также определяли по гидролизу синтетических хромогенных субстратов, инкубируя реакционную смесь при температурах от 22° до 65° в присутствии 0,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  и в его отсутствие.

При изучении термостабильности растворы ферментов инкубировали 2 часа при температурах 22° - 60° в присутствии и в отсутствие 0,5 мМ  $\text{CaCl}_2$  и определяли активность для протеиназ по гидролизу синтетических субстратов. Контролем считали активность ферментов без предварительного прогрева.

**Определение субстратной специфичности поздних протеиназ.** Субстратную специфичность глутамилэндопептидазы определяли по гидролизу синтетических тетрапептидов Z-Ala-Ala-Met-Glu-pNa, Z-Ala-Ala-Trp-Glu-pNa, Z-Ala-Ala-Phe-Glu-pNa, Z-Ala-Ala-Leu-Glu-pNa, Z-Gly-Ala-Ala-Glu-pNa, Z-Ala-Ala-Trp-Asp-pNa, Z-Ala-Ala-Leu-Asp-pNa, Z-Ala-Ala-Phe-Asp-pNa, Z-Ala-Ala-Met-Asp-pNa, Z-Gly-Ala-Ala-Asp-pNa, а также Z-Glu-pNa [Люблинская с соавт., 1987]. Расщепление синтетических олигопептидов проводили в 0,025 М трис-HCl буфере, pH 8,5 при 37° в течение 30 минут. К растворам субстратов в концентрации 1 мг/мл в 0,025 М трис-HCl, pH 8,5 с 5 мМ  $\text{CaCl}_2$  добавляли 10 мкл раствора фермента (1 мкг/мл) в том же буфере и инкубировали 4 часа при 37°. Высушенные гидролизаты разделяли в режиме FPLC на колонке (4,6x250 мм) Ultrasphere Octyl, используя линейный градиент вода – 70% ацетонитрила в присутствии 0,1%  $\text{CF}_3\text{COOH}$ . Элюаты регистрировали при 215 и 280 нм и анализировали на аминокислотном анализаторе Hitachi 835 (Япония).



**Определение аминокислотного состава и N-концевой последовательности ферментов.** Аминокислотный состав протеиназ определяли после гидролиза 5,7 н НСІ при 105° в течение 48 часов на аминокислотном анализаторе Hitachi 835 (Япония). Остатки полуцистина и метионина определяли после их окисления надмуравьиной кислотой, триптофан – после гидролиза белка метансульфоновой кислотой в присутствии 0,2%-ного триптамина. N-концевую последовательность глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы определяли по методу Эдмана в образцах, полученных после дополнительной очистки хроматографией на колонке (4,6x100 мм) Aquapore («Applied Biosystems», USA) в градиенте концентраций (15-16%) ацетонитрила с 0,1% трифлуороуксусной кислотой в течение 40 мин с помощью HPLC. Белки затем иммобилизовали на мембранах Immobilon P и секвенировали на приборе Knauer-816 («Applied Biosystem» 120 A PИH, Analyzer One Line, USA).

### Результаты и их обсуждение

Нами показано, что в поздней стационарной фазе роста клетки *B. intermedius* секретируют два протеолитических фермента: глутамилэндопептидазу с максимальной активностью на 40-й час роста и субтилизиноподобную протеиназу с максимальной активностью на 44 час (рис. 1).

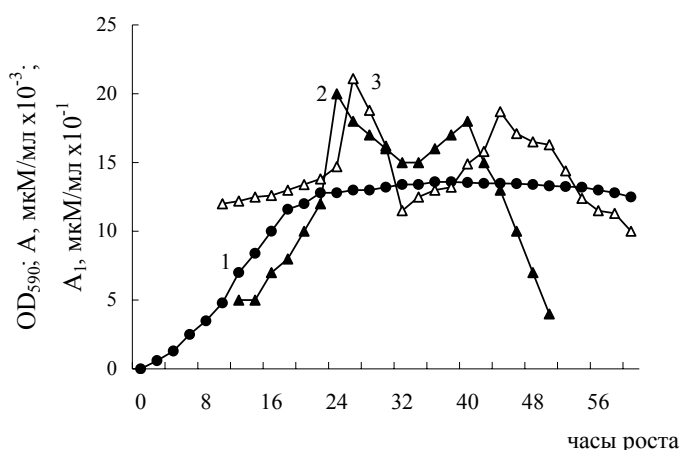


Рис. 1. Динамика роста и биосинтеза протеиназ *Bacillus intermedius*  
 1 - рост культуры (OD<sub>590</sub>), 2 - активность глутамилэндопептидазы (A<sub>1</sub>),  
 3 - активность субтилизиноподобной протеиназы (A)

Для отличия поздних ферментов от известных и хорошо изученных ферментов ранней стационарной фазы роста *B. intermedius* мы обозначили обнаруженные ферменты индексом 2.

С помощью биохимического маркера β-галактозидазы определяли целостность клеток в момент максимального накопления поздних протеиназ. Активность β-галактозидазы в культуральной жидкости остается на низком уровне до 44 часа роста, а к 50 часу резко возрастает. При этом количество свободных спор достигает своего максимума на 56 – 60 час роста (80%). Следует отметить также, что максимальная активность поздних протеиназ соответствует поздним стадиям спорообразования (стадии V-VII) (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о целостности клеток в период накопления ферментов поздней стационарной фазы роста [Балабан с соавт., 2001].

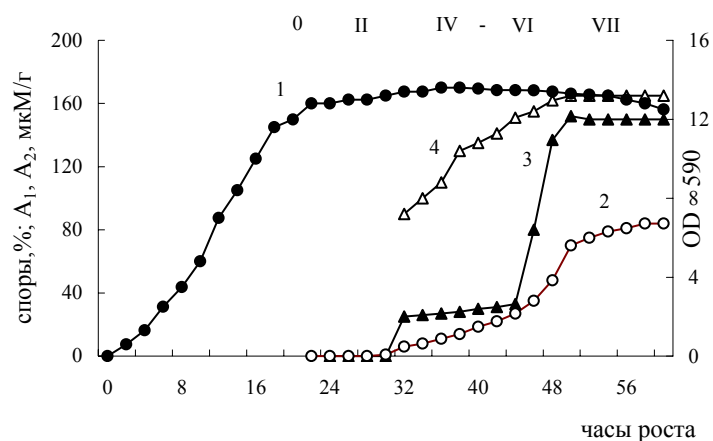


Рис. 2. Динамика спорообразования и накопления  $\beta$ -галактозидазной активности *B. intermedius*

1- рост культуры ( $OD_{590}$ ), 2 - количество спор, 3 - активность  $\beta$ -галактозидазы в культуральной жидкости ( $A_1$ ), 4 - активность  $\beta$ -галактозидазы в лизатах клеток ( $A_2$ )

## I. Подбор компонентов питательной среды для максимальной продукции ферментов *B. intermedius*

Синтез внеклеточных ферментов в значительной степени определяется составом среды культивирования [Adinarayana, Ellaiah, 2002]. Мы подбирали оптимальное соотношение концентраций двух основных для максимальной продукции ферментов компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата в двухфакторных экспериментах с последующим обсчетом результатов в программе «BIOPT». Было установлено, что оптимальные концентрации пептона и неорганического фосфата, необходимые для максимальной активности и продуктивности глутамилэндопептидазы 2, составляют 19 и 0,3 г/л соответственно, для максимальной активности и продуктивности субтилизиноподобной протеиназы 2 – 22 и 0,24 г/л, соответственно (рис.3). Полученные данные коррелируют с результатами для ранних белков *B. intermedius*, лишь для глутамилэндопептидазы 2 неорганического фосфата требуется больше, чем для глутамилэндопептидазы 1 (0,3 г/л против 0,2 г/л, соответственно) [Шакиров с соавт., 2000].

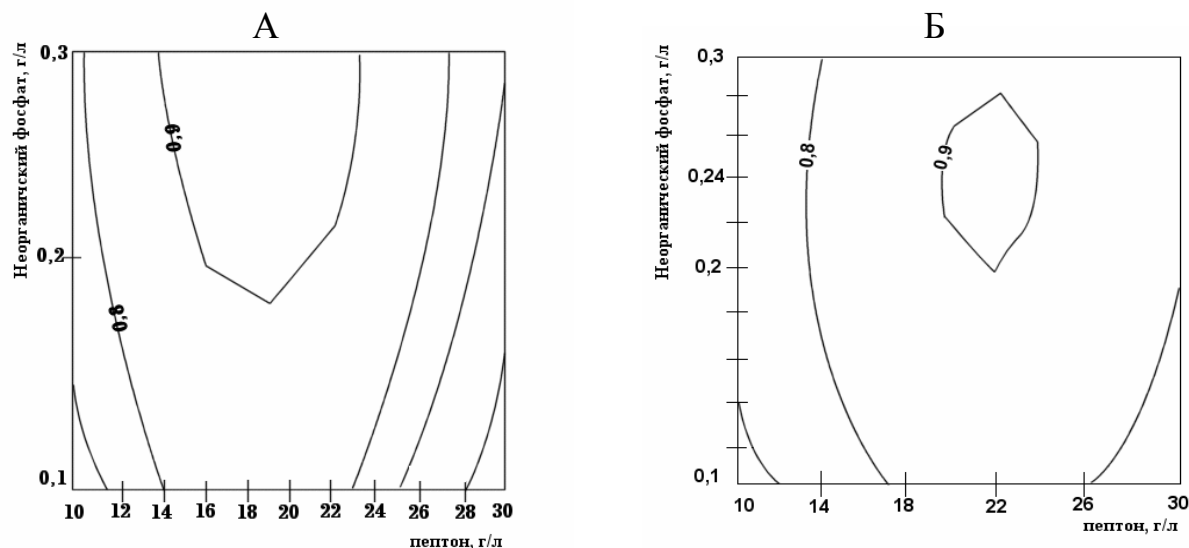


Рис. 3. Влияние соотношения концентраций пептона и неорганического фосфата на накопление ферментов поздней фазы роста. За единицу принята максимальная активность протеиназы. А – глутамилэндопептидаза, Б – субтилизиноподобная протеиназа

Исследовали влияние на биосинтез глутамилэндопептидазы 2 и субтилизиноподобной протеиназы 2 *B. intermedius* ряда индивидуальных аминокислот – ароматической (триптофан), гидрофобных (аланин, валин и лейцин), а также лизина. Внесение в среду, содержащую пептон, индивидуальных аминокислот в концентрации 1% вызывало интенсивный рост клеток *B. intermedius*, но ингибировало синтез протеиназ поздней стационарной фазы роста. Аланин, лейцин, лизин и триптофан снижали продуктивность культуры в отношении синтеза глутамилэндопептидазы 2 на 45-50%, валин - на 20%. Наибольший ингибиторный эффект для субтилизиноподобной протеиназы 2 наблюдался при внесении в среду культивирования 1% аланина и валина (до 40%). Исследование влияния ионов аммония в виде цитрата аммония на продукцию поздних протеиназ *B. intermedius* показало подавляющий эффект (до 30%) в отношении синтеза обоих ферментов. Наличие хлористого аммония в среде культивирования не влияло на продуктивность культуры. Похожие результаты получены при исследовании влияния индивидуальных аминокислот и солей аммония на продукцию ранних протеиназ *B. intermedius* [Ицкович с соавт., 1995; Шакиров с соавт., 2000]. Таким образом, присутствие в среде аминокислот и ионов аммония подавляет синтез протеиназ *B. intermedius* по типу репрессии конечным продуктом, поэтому внесение их в среду культивирования нецелесообразно.

При исследовании влияния дрожжевого экстракта на биосинтез глутамилэндопептидазы 2 и субтилизиноподобной протеиназы 2 *B. intermedius* установлено, что при добавлении его в среду в концентрации 0,1–1,0% рост культуры не изменяется, а продуктивность культуры в отношении синтеза обеих протеиназ снижается по сравнению с контрольным вариантом. При дальнейшем увеличении концентрации дрожжевого экстракта в среде это снижение становится интенсивнее. Таким образом, внесение дрожжевого экстракта в среду для биосинтеза протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* нецелесообразно. Такие же результаты получены для глутамилэндопептидазы 1,

секретируемой в период вегетативного роста, тогда как для субтилизиноподобной протеиназы 1, секретируемой в начале стационарной фазы роста *B. intermedius*, показано увеличение активности фермента при внесении в среду 0,5% кукурузного экстракта [Ицкович с соавт., 1995].

Внесение в среду культивирования 0,1–1,0% желатина и казеина приводит к увеличению роста и к снижению удельной активности глутамилэндопептидазы 2. Подобные результаты получены и для глутамилэндопептидазы 1. Для субтилизиноподобной протеиназы 2 *B. intermedius* показано увеличение продуктивности культуры в отношении синтеза фермента на 40%. Таким образом, для максимального накопления субтилизиноподобной протеиназы 2 необходимо добавлять в питательную среду 0,1% казеина.

Исследовали влияние ионов двухвалентных металлов на биосинтез протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius*. Для глутамилэндопептидазы 2 установлено, что в присутствии 5 мМ ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  увеличивается удельная активность на 13% и 20% соответственно, для субтилизиноподобной протеиназы 2 - 5 мМ  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  увеличивают удельную активность на 30% и 10%, соответственно. Таким образом, для максимального накопления протеиназ *B. intermedius* поздней фазы роста необходимо вносить в питательную среду 5 мМ ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ . Ранее были получены схожие данные о положительном влиянии ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  на биосинтез глутамилэндопептидазы 1 исходным штаммом *B. intermedius* и рекомбинантным штаммом *B. subtilis* [Габдрахманова с соавт., 2000].

Для выяснения влияния глюкозы на синтез сериновых протеиназ в поздней стационарной фазе роста культуры, в питательную среду добавляли 1% глюкозы на 34-40 часы роста *B. intermedius*. Показано, что уровень активности глутамилэндопептидазы 2 и субтилизиноподобной протеиназы 2 не понижается в присутствии глюкозы в течение 6 часов после внесения ее в питательную среду, то есть не происходит репрессии биосинтеза ферментов глюкозой. Из литературы известно, что глюкоза, внесенная в питательную среду перед началом культивирования, подавляет синтез протеолитических ферментов. Подобные результаты были получены и для глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы ранней стационарной фазы роста *B. intermedius* [Шакиров с соавт., 2000].

Определяли количество спор в культуральной жидкости *B. intermedius* в отсутствие глюкозы и при внесении ее в среду на 32 час, то есть перед появлением в культуральной жидкости поздних белков. Показано, что свободные споры появляются в контрольной среде и в среде с глюкозой на 38-40 часы роста культуры. В последующие часы культивирования увеличение количества свободных спор наблюдается на обеих средах, но на контрольной среде лизис клеток и освобождение спор идет интенсивнее, чем на среде с глюкозой. Полученные данные свидетельствуют, что процессы спорообразования и синтеза протеолитических ферментов на поздних стадиях развития культуры взаимосвязаны и не регулируются по механизму катаболитной репрессии [Шарипова с соавт., 2000]. По-видимому, на разных этапах развития культуры происходит смена механизмов регуляции экспрессии поздних генов, которые

активируются в период стационарного роста иным способом, чем в период вегетативного роста.

## **II. Выделение ферментов *Bacillus intermedius* поздней фазы роста и определение их свойств**

Выделение и очистку сериновых протеиназ поздней стационарной фазы роста *Bacillus intermedius* 3-19 проводили с помощью ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке MonoS. После хроматографии на MonoS были получены две белковые фракции, которые по гидролизу синтетических хромогенных субстратов были идентифицированы как глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа (рис. 4). Так как в результате одностадийной высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке MonoS препараты белков не были гомогенными, проводили рехроматографию в тех же условиях. За три стадии очистки получены препараты белков, чистота которых подтверждена электрофорезом в 12% ПААГ (рис. 5). Молекулярная масса глутамилэндопептидазы 2, определенная нами электрофоретически, равна 26,5 кДа, молекулярная масса, рассчитанная по аминокислотной последовательности, равна 23 кДа [Rebrikov et al., 1999]. Электрофорез препарата субтилизиноподобной протеиназы 2 показал наличие одного полипептида с молекулярной массой 28 кДа, что совпадает с молекулярной массой, рассчитанной по аминокислотной последовательности (27,5 кДа) [Sharipova et al, 2006]. Константа Михаэлиса глутамилэндопептидазы 2 равна 0,5 мМ, в то время как константа Михаэлиса глутамилэндопептидазы 1 *B. intermedius* равна 6 мМ [Leschinskaya et al., 1997]. Каталитическая константа глутамилэндопептидазы 2 из *B. intermedius* 3-19 – 81 сек<sup>-1</sup>. Константы Михаэлиса и  $K_{кат}$  субтилизиноподобной протеиназы 2 равны 0,0054 мМ и 16545 сек<sup>-1</sup>, соответственно. Константы Михаэлиса  $K_{кат}$  субтилизиноподобной протеиназы 1 равны 1,25 мМ и 0,15 сек<sup>-1</sup>, соответственно [Ицкович с соавт., 1997]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидролитические ферменты, секретируемые клетками *Bacillus intermedius* 3-19 в поздней стационарной фазе роста, значительно активнее связывают и расщепляют субстрат, чем протеиназы ранней стационарной фазы роста. Высокая протеолитическая активность субтилизиноподобной протеиназы 2, возможно, связана с её функциональной ролью на поздних стадиях спорообразования, когда клетка подвергается значительным физиологическим и морфологическим изменениям. Изоэлектрическая точка глутамилэндопептидазы 2 *B. intermedius* 3-19 равна 8,4 и соответствует изоэлектрической точке глутамилэндопептидазы 1.

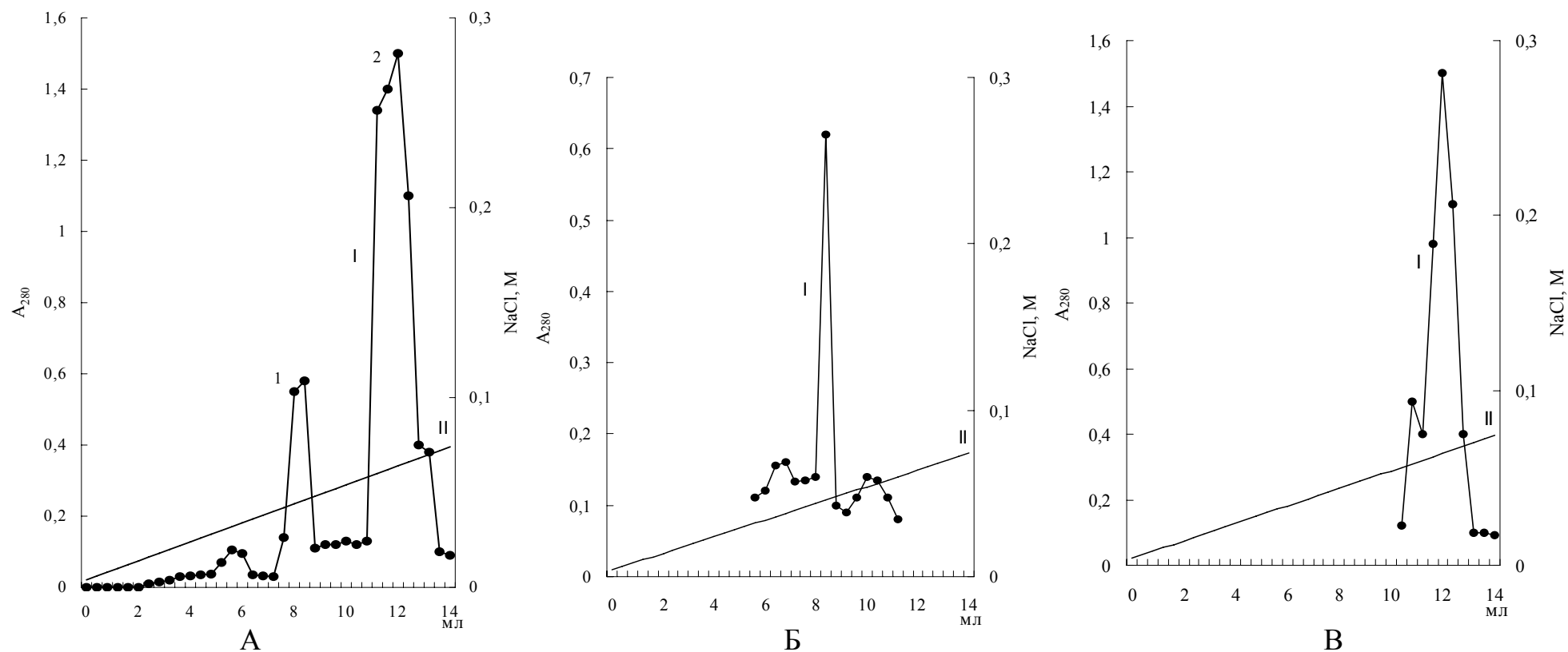


Рис. 4. А. Хроматография протеиназ *B. intermedius* на колонке MonoS

1 – протеиназа, активная по гидролизу субстрата Z-Glu-pNA,

2 - протеиназа, активная по гидролизу субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA;

Б. Рехроматография глутамилэндопептидазы *B. intermedius* на колонке MonoS;

В. Рехроматография субтилизиноподобной протеиназы 2 *B. intermedius* на колонке MonoS

I -  $A_{280}$

II – градиент NaCl (0-0,5 M) в 15 mM Na-ацетатном буфере pH 6,3, содержащем 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$

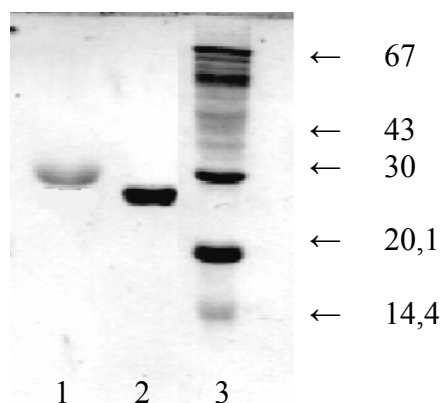


Рис. 5. Электрофорез внеклеточных щелочных протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* в ПААГ с DS-Na. 1 – субтилизиноподобная протеиназа; 2 – глутамилэндопептидаза; 3 – маркеры: бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоксиангидраза (30 кДа), ингибитор трипсина (20,1 кДа), лизоцим (14,4 кДа)

Изоэлектрическая точка субтилизиноподобной протеиназы 2 соответствует рН 9,2 (табл.1).

Таблица 1

Физико-химические свойства поздних протеиназ *B. intermedius* 3-19

Свойства	Глутамилэндопептидаза	Субтилизиноподобная протеиназа
Молекулярная масса (ЭФ), кДа	26,5	28
Изоэлектрическая точка	8,4	9,2
Оптимум рН по казеину	7,2 и 9,5	8,5
по синт. субстрату	8,5	9,0
рН-стабильность по синт. субстрату	7,2 – 9,5	7,2 – 9,5
Оптимум температуры (Ca <sup>2+</sup> ) по синт. субстрату, °	55	55
Термостабильность (Ca <sup>2+</sup> ) по синт. субстрату, °	37 - 50	22 - 45

Глутамилэндопептидазы устойчивы к действию различных ингибиторов. Активность глутамилэндопептидазы 2 подавляется ингибитором сериновых протеиназ — DFP. Другой ингибитор сериновых протеиназ - PMSF - оказывает незначительное влияние на активность фермента. Глутамилэндопептидаза 2 не чувствительна к бензамидину, ЭДТА и белковым ингибиторам, р-СМВ незначительно инактивирует фермент. Похожие результаты получены для глутамилэндопептидазы 1 [Leschinskaya et al., 1997].

При изучении влияния ингибиторов на активность субтилизиноподобной протеиназы 2 было показано, что специфические ингибиторы сериновых протеиназ PMSF и DFP полностью ингибируют, а ингибиторы нейтральных протеиназ ЭДТА,

о-фенантролин и ТЛСК не влияют на активность фермента. р-СМВ уменьшает активность протеиназы на 25%. Природные белковые ингибиторы по-разному влияют на активность субтилизиноподобной протеиназы 2: утиный овомукоид снижает активность на 70%, соевый ингибитор трипсина – на 25%, а ингибитор из морской анемоны не влияет на активность фермента (табл. 2). Похожие результаты были получены ранее для субтилизиноподобной протеиназы 1, секретируемой в ранней стационарной фазе роста клетками *B. intermedius*.

Таблица 2

Влияние ингибиторов на активность сериновых протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius*

Ингибитор	Молярное соотношение фермент:ингибитор	Остаточная активность глутамилэндопептидазы, %	Остаточная активность субтилизиноподобной протеиназы, %
DFP	1:100	0	0
PMSF	1:100	84	0
TLCK	1:100	-	100
EDTA	1:100	100	100
о-фенантролин	1:100	-	100
р-СМВ	1:130	82	75
HgCl <sub>2</sub>	1:100	-	32
Утиный овомукоид	1:10	100	30
Ингибитор из морской анемоны	1:10	100	100
Соевый ингибитор трипсина	1:10	100	75

Таким образом, результаты исследования влияния ингибиторов на активность ферментов подтвердили, что поздние протеиназы *B. intermedius* относятся к классу сериновых протеиназ.

По физико-химическим свойствам глутамилэндопептидаза 2 похожа на глутамилэндопептидазу 1 и на ферменты того же типа, выделенные из других источников. Глутамилэндопептидаза 2 имеет один рН оптимум при гидролизе синтетического субстрата (8,5) и два рН оптимума при гидролизе казеина (7,2 и 9,5). До сих пор наличие двух рН оптимумов при гидролизе природного субстрата не объяснено в литературе. Фермент рН стабилен в том же диапазоне, что и другие глутамилэндопептидазы (7,2 – 9,5) [Руденская, 1998].

Температурный оптимум глутамилэндопептидазы 2, определенный по гидролизу синтетического субстрата, в отсутствие ионов Ca<sup>2+</sup> равен 50°. В присутствии 5 мМ Ca<sup>2+</sup> температурный оптимум смещается к 55°. Для глутамилэндопептидазы 1 показано, что в отсутствие Ca<sup>2+</sup> равен 55°, в присутствии Ca<sup>2+</sup> он смещается к 65°, и при этом повышается активность на 30% [Leschinskaya et al., 1997]. Глутамилэндопептидаза 2, также как и глутамилэндопептидаза 1, не теряет своей активности в интервале температур 37 - 50° в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup> после предварительного прогрева в течение двух часов. В отсутствие ионов Ca<sup>2+</sup> в этих условиях теряется 50% активности.



Субтилизиноподобная протеиназа 2 проявляет максимальную активность при pH 9,0 на синтетическом субстрате и на казеине – 8,5. Фермент стабилен в интервале pH 7,2 – 9,5. Температурный оптимум соответствует 55°, активность фермента сохраняется в интервале температур 22 - 45° при наличии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Эти результаты полностью коррелируют с данными, полученными для других бациллярных ферментов [Степанов с соавт., 1980; Хайдарова с соавт., 1990].

Итак, наблюдаемые отклонения при сравнении энзиматических свойств ранних и поздних протеиназ практически не значительны.

Глутамилэндопептидаза при гидролизе синтетических тетрапептидов проявляет предпочтительную специфичность к связям, образованным остатками глутаминовой кислоты в положении P1 по сравнению с остатками аспарагиновой кислоты. Кроме того, в положении P2 наиболее предпочтительными являются связи, образованные остатками фенилаланина и метионина (табл. 3). Аналогичные результаты получены для глутамилэндопептидазы 1 *B. intermedius*. При исследовании специфичности протеаз из *B. licheniformis*, *S. griseus* и *S. aureus* также было показано, что ферменты гидролизуют связи Glu-Xaa в тысячу раз быстрее, чем связи Asp-Xaa [Breddam, Meldal, 1992].

Таблица 3

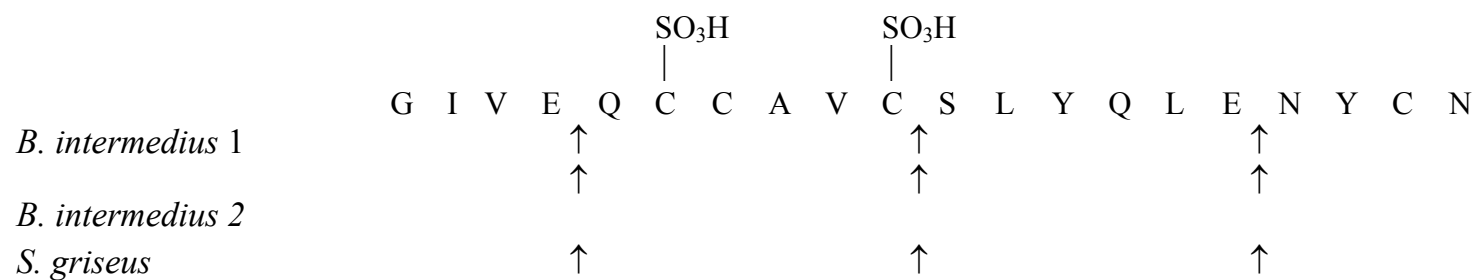
Гидролиз синтетических субстратов глутамилэндопептидазой *B. intermedius*

№	Субстрат	Активность, ед/мг
1	Z-Ala-Ala- Met-Glu-pNA	1,62
2	Z-Ala-Ala-Trp-Glu-pNA	0,75
3	Z-Ala-Ala-Phe-Glu-pNA	1,86
4	Z-Ala-Ala-Leu-Glu-pNA	1,12
5	Z-Gly-Ala-Ala-Glu-pNA	1,12
6	Z-Glu-pNA	0,51
7	Z-Ala-Ala-Trp-Asp-pNA	0,03
8	Z-Ala-Ala-Leu-Asp-pNA	0,05
9	Z-Ala-Ala-Phe-Asp-pNA	0,02
10	Z-Ala-Ala-Met-Asp-pNA	0,05
11	Z-Gly-Ala-Ala-Asp-pNA	0,02

Субстратная специфичность глутамилэндопептидазы 2 по гидролизу белковых субстратов аналогична таковой для глутамилэндопептидазы 1. Эти ферменты гидролизуют связи в А и В цепях окисленного инсулина не только по глутаминовой, но и по цистеиновой кислоте, которая образуется при окислении цистеина (рис. 6).

Определение субстратной специфичности субтилизиноподобной протеиназы 2 по расщеплению В цепи окисленного инсулина показало, что фермент обладает широкой субстратной специфичностью – после гидролиза обнаруживается большое количество различных белковых фрагментов, кроме того, гидролиз идет гораздо глубже, чем у других ранее описанных субтилизиноподобных белков. Субтилизиноподобная протеиназа 2 активно гидролизует связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных аминокислот лейцина, фенилаланина и тирозина (Leu11-Val12, Leu15-Tyr16, Phe24-Phe25 и т.д.), а также гидрофильных

## А-Цепь инсулина



## В-Цепь инсулина

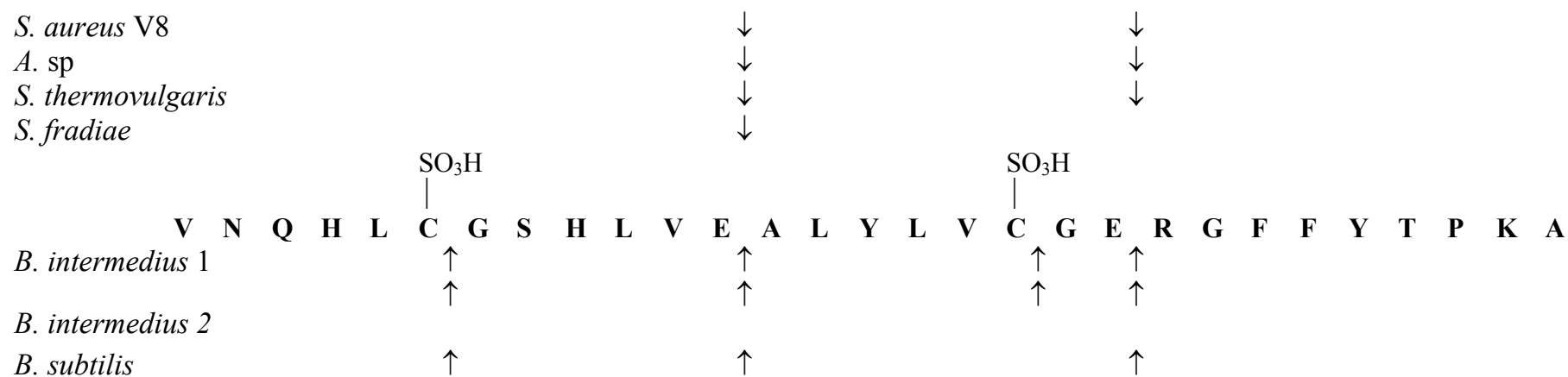


Рис. 6. Гидролиз А и В-цепей окисленного инсулина глутамилэндопептидазами различного происхождения

аминокислот – серина, цистеина, глутамина (рис. 7).

Для субтилизиноподобной протеиназы 1 получены похожие результаты. Таким образом, субстратная специфичность протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* не меняется на разных стадиях роста культуры и биосинтеза ферментов.

Аминокислотный состав глутамилэндопептидазы 2 близок к таковому для глутамилэндопептидазы 1. Анализ аминокислотной последовательности также показал наличие двух полуцистинов [Rebrikov et al., 1999]. N-концевая последовательность глутамилэндопептидазы 2 на протяжении десяти аминокислотных остатков полностью совпадает с глутамилэндопептидазой 1.

Определены аминокислотный состав и N-концевая последовательность субтилизиноподобной протеиназы 2. Молекула субтилизиноподобной протеиназы 2 состоит из 272 аминокислотных остатков и не содержит полуцистинов, что характерно для классических субтилизинов. N-концевые последовательности раннего и позднего ферментов на протяжении 10 аминокислот идентичны.

Таким образом, на основании сравнения физико-химических свойств протеиназ, синтезирующихся клетками *B. intermedius* в разные фазы развития культуры, влияния ингибиторов на активность ферментов, субстратной специфичности, аминокислотного состава и N-концевой последовательности можно заключить, что ферменты не полностью идентичны. Нами установлены различия в каталитических константах ранних и поздних протеиназ, причем ферменты поздней стационарной фазы роста активнее связывают и расщепляют субстрат по сравнению с ранними ферментами. Это можно объяснить тем, что на поздних стадиях роста, когда запас питательных веществ исчерпан, возрастает потребность в ферментах с высокой молекулярной активностью. N-концевые последовательности ранних и поздних ферментов идентичны, что предполагает идентичный фолдинг – то есть ранние и поздние белки являются продуктами экспрессии одного гена. В то же время выявленные различия в свойствах белков свидетельствуют о некоторых структурных отличиях. Учитывая идентичность N-концевых последовательностей ранних и поздних белков, можно предположить, что различия в свойствах ферментов обусловлены посттранскрипционной модификацией этих белков (ацетилированием, метилированием и др.).

Известно, что эукариотические клетки, а также клетки некоторых микроорганизмов, и в частности бацилл, способны к считыванию мРНК одного гена с различных промоторов [Errington, 1993; Loh et al., 1999]. К тому же в поздней стационарной фазе происходит изменение экспрессии генов, связанное со сменой основных сигма-факторов транскрипции, что отчасти может объяснить выявленные различия в аминокислотном составе исследованных ферментов поздней стационарной фазы роста по сравнению с ранними белками. Также на этот процесс может оказывать влияние вариабельность задействованных в биосинтезе стартовых кодонов.

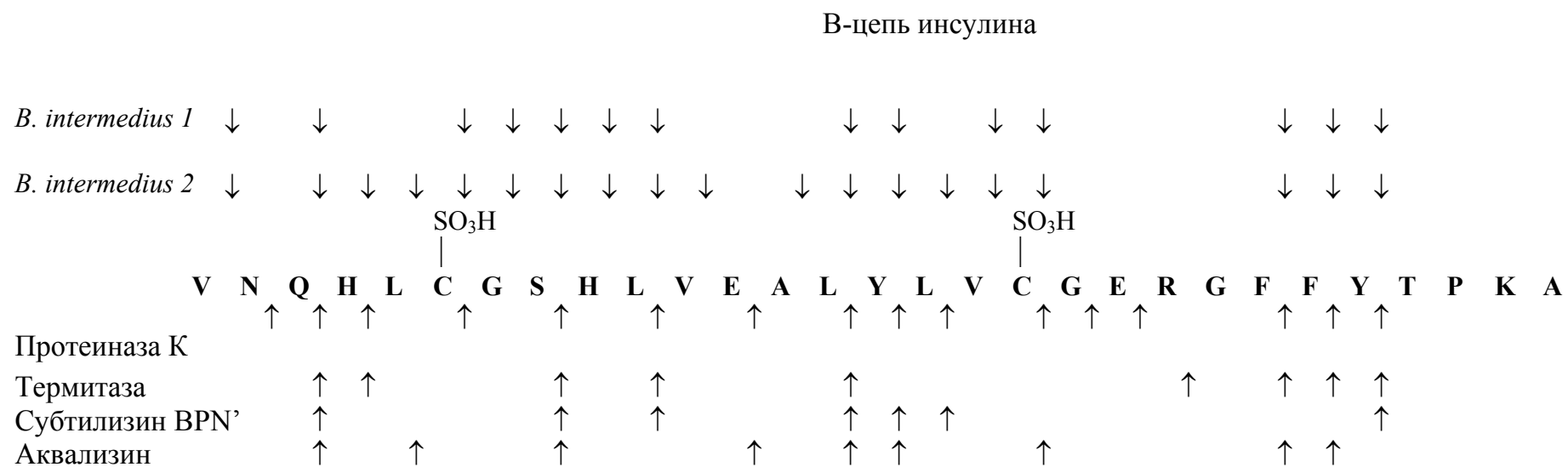


Рис. 7. Гидролиз В-цепи окисленного инсулина субтилизиноподобными протеиназами различного происхождения

Данные литературы свидетельствуют также о влиянии собственных антагонистических факторов, выделяемых микроорганизмами в фазе замедления роста, на транскрипцию мРНК, проявляющемся в посттранскрипционных изменениях аминокислотного состава белка, как это показано для *Tolypocladium sp.* [Сазыкин и Навашин, 1991]. Не исключено, что бациллы также выделяют антагонистические факторы со сходным механизмом действия.

Основной вывод, на наш взгляд, заключается в том, что глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* претерпевают различные посттранскрипционные модификации.

### Выводы

1. Подобран состав питательной среды для максимальной продукции протеиназ поздней стадии роста *B. intermedius*: для максимального выхода глутамилэндопептидазы среда культивирования должна содержать следующие компоненты (г/л): пептон – 19, неорганический фосфат – 0,3,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,55,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,5,  $\text{NaCl}$  – 3,0; для субтилизиноподобной протеиназы (г/л): пептон – 22, неорганический фосфат – 0,24,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,55,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,5,  $\text{NaCl}$  – 3,0, казеин – 1,0.
2. Из культуральной жидкости *B. intermedius* получены гомогенные препараты глутамилэндопептидазы 2 с удельной активностью 1,02 ед/ $A_{280}$  и выходом 19,6% и субтилизиноподобной протеиназы 2 с удельной активностью 25,9 ед/ $A_{280}$  и выходом 11%.
3. Исследовано влияние ингибиторов на активность глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы. Показано, что исследуемые ферменты по типу ингибирования относятся к классу сериновых протеиназ.
4. Определены энзиматические и каталитические свойства белков. Показано, что по энзиматическим свойствам протеиназы *B. intermedius* поздней фазы роста похожи на ферменты начала стационарной фазы роста, тогда как каталитические характеристики ранних и поздних ферментов *B. intermedius* отличаются.
5. Субстратная специфичность протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* не меняется на разных стадиях роста культуры и биосинтеза ферментов.
6. Определены аминокислотные составы и N-концевые последовательности глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы поздней стадии роста *B. intermedius*. Установлена 100% гомология N-концевых последовательностей соответствующих ферментов в ранней и поздней стационарной фазе роста бактерий.

## Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Балабан Н.П. Протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемые в поздней стационарной фазе роста / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Ю.С. Токмакова, **Е.А. Соколова**, И.Б. Лещинская // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, серия Биология. – 2001. – Вып.3. – С. 45-50.
2. Габдрахманова Л.А. Факторы среды, влияющие на продукцию глутамилэндопептидазы стрептомицин-устойчивых штаммов *Bacillus intermedius* 3-19 / Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Ю.С. Токмакова, **Е.А. Соколова**, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. - 2002. - Т. 71. - №3. - С. 323-329.
3. Nelly P. Balaban, Proteinases from *Bacillus intermedius* secreted in the late stages of sporulation / Nelly P. Balaban, Leila A. Gabdrakhmanova, Margarita R. Sharipova, **Evgeniya A. Sokolova**, Galina N. Rudenskaya, Inna B. Leshchinskaya // Med Sci Monit. - 2002. - 8(5). - BR.168-171.
4. Балабан Н.П. Синтез и секреция протеиназ *Bacillus intermedius* на поздних стадиях спорообразования / Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, А.М. Марданова, Ю.С. Токмакова, **Е.А. Соколова**, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. - 2003. - Т. 72. - С. 338-342.
5. Балабан Н.П. Получение и характеристика глутамилэндопептидазы 2 *Bacillus intermedius* / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, **Е.А. Соколова**, А.В. Гарусов, Е.И. Мильготина, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Биохимия. - 2003. - Т. 68. - С. 1514-1521.
6. Марданова А.М. Очистка и характеристика субтилизиноподобной сериновой протеиназы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 / А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, **Е.А. Соколова**, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Биохимия. - 2004. - Т. 69. - № 4. - С. 519-526.
7. Balaban N.P. Biosynthesis of serine proteinases of *B.intermedius* on the late stage of bacterial growth / L.A. Gabdrakhmanova, M.R. Sharipova, A.M. Mardanova, **E.A. Sokolova**, L.A. Malikova, I.B. Leshchinskaya // J. Basic Microbiol.- 2005. – V.44 - № 6. – P. 415-423.
8. **Соколова Е.А.** Оптимизация выделения внеклеточных протеиназ *Bacillus intermedius* 3-19, секретируемых бактериями в поздней стационарной фазе роста / Е.А. Соколова, Т.Р. Шамсутдинов, Н.П. Балабан // Вестник Казанского государственного университета. Принята в печать в апреле 2006г.
9. **Соколова Е.А.** Биосинтез глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными штаммами *Bacillus subtilis* / Е.А. Соколова, И.Е. Вишняков, Л.А. Габдрахманова // I Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета. – Казань, 2000. - С. 91-92.
10. **Соколова Е. А.** Выделение и характеристика щелочной протеиназы *Bacillus intermedius* / Е.А. Соколова, Ю.С. Токмакова // Материалы XXXIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-

технический прогресс», посвященной 70-летию академика В.А. Коптюга. – Новосибирск, 2001. - С. 34-35.

11. Токмакова Ю.С. Протеиназы *Bacillus intermedius* 3-19, секретируемые в стационарной фазе роста / Ю.С. Токмакова, **Е.А. Соколова**, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // XII Юбилейная конференция «Ферменты микроорганизмов». Сборник докладов. – Казань, 2001. – С. 61-62.

12. **Соколова Е.А.** Глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* 3-19 поздней стационарной фазы роста / Е.А. Соколова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // II Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета. – Казань, 2001. – С. 86.

13. Яхъяев А.М. Влияние компонентов питательной среды на продукцию субтилизина, секретируемого *Bacillus intermedius* 3-19 на поздних стадиях спорообразования / А.М. Яхъяев, **Е.А. Соколова**, Н.П. Балабан // II Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета. – Казань, 2001. – С. 105.

14. **Соколова Е.А.** Выделение и характеристика внеклеточных субтилизинов *Bacillus intermedius* 3-19 поздней стационарной фазы роста / Е.А. Соколова, А.М. Яхъяев, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // I Форум молодых ученых и специалистов республики Татарстан. – Казань, 2001. — С. 8.

15. Балабан Н.П. Секретируемые протеиназы *Bacillus intermedius* поздней стационарной фазы роста / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Е.А. **Соколова**, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // V симпозиум по химии протеолитических ферментов: Тез. докл. и стенд. сообщ. – Москва, 2002. - С. 48.

16. Шарипова М.Р. Глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* на разных фазах роста / М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, А.М. Марданова, **Е.А. Соколова**, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // V симпозиум по химии протеолитических ферментов: Тез.докл и стенд. сообщ.- Москва, 2002. - С. 109.

17. **Соколова Е.А.** Субтилизины *Bacillus intermedius* поздней стационарной фазы роста / Е.А. Соколова, Н.П. Балабан // III Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета. – Казань, 2003 – С. 78.

18. Балабан Н.П. Получение и характеристика протеиназ *Bacillus intermedius* 3-19, секретируемых на поздних стадиях развития / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, **Е.А. Соколова**, Г.Н. Руденская, Г.И. Эль-Регистан, И.Б. Лещинская // Тез. научн. докл. «III Съезд Биохимического общества». - Санкт-Петербург, 2002. - С. 593.

19. **Соколова Е.А.** Глутамилэндопептидаза *Bacillus intermedius* поздней стационарной фазы роста / Е.А. Соколова, Н.П. Балабан // Сборник тезисов докладов итоговой научной студенческой конференции 2002 года. - Казань, 2003. – С. 15.

20. **Evgeniya A. Sokolova** Serine proteinases from *Bacillus intermedius* 3-19, secreted at the late stationary phase of bacterial growth / Evgeniya A. Sokolova,

Nelly P. Balaban, Leila A. Gabdrakhmanova, Margarita R. Sharipova, Inna B. Leshchinskaya.. // FEMS Congress of European Microbiologist «Bacillus-2003». - Ljubljana, Slovenia, 2003. – P. 17.

21. Рудакова Н.Л. Щелочные и нейтральные протеиназы *Bacillus intermedius* на поздних стадиях роста / Н.Л. Рудакова, **Е.А. Соколова**, Н.П. Балабан // Материалы XLII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» секция биология. – Новосибирск, 2004. – С. 33.

22. Рудакова Н.Л. Протеиназы *Bacillus intermedius* на поздних стадиях роста / Н.Л. Рудакова, **Е.А. Соколова**, Н.П. Балабан // IV научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ «Материалы и технологии XXI века, Тезисы докладов. – Казань, 2004. – С. 66.

23. Рудакова Н.Л. Влияние компонентов питательной среды на биосинтез нейтральной протеиназы рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis JB 20-36 (met)* / Н.Л. Рудакова, **Е.А. Соколова** // Сборник тезисов 9-й международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пушкино, 2005. – С. 210.

24. Зайнетдинова А.Х. Влияние экзогенных факторов на продукцию глутамилэндопептидазы *Bacillus cereus* / А.Х. Зайнетдинова, **Е.А. Соколова**, Л.А. Габдрахманова // Тезисы Всероссийской молодежной школы-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии». – Москва, 2005. – С. 26 - 27.